

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.005

MIA2 慢病毒表达载体构建及其表达活性的研究*

杨花^{1,3}, 杨少奇^{2△}, 何芳², 胡建国², 李鹏^{1,2}

(1. 宁夏医科大学, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院消化内科, 银川 750004;
3. 宁夏医科大学总医院 NICU, 银川 750004)

摘要:目的 构建黑色素瘤抑制蛋白 2(MIA2)慢病毒表达载体,并将其通过脂质体转染到 HepG2 细胞中,观察转染前后 MIA2 表达变化及其对细胞凋亡的影响。方法 以 pDONR223-MIA2 为模板,PCR 扩增 MIA2,构建 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 慢病毒表达载体,体外瞬时转染肝癌细胞 HepG2,荧光显微镜下观察 MIA2 的表达情况,用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 HepG2 细胞中 MIA2 mRNA 的表达情况,噻唑蓝(MTT)法和克隆形成实验检测细胞增殖的情况。结果 成功构建 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 慢病毒表达载体;RT-PCR 结果显示,阴性对照组与实验组细胞 MIA2 mRNA 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$);MTT 检测发现,实验组细胞增殖数目较阴性对照组明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$);此外,实验组的克隆形成数和细胞迁移数均较阴性对照组明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 pIRES2-ZsGreen1-MIA2 可显著下调 MIA2 的表达水平进而抑制肝癌细胞 HepG2 的体外增殖及迁移能力。

关键词:肝肿瘤;细胞增殖;黑色素瘤抑制蛋白 2;HepG2 细胞

中图分类号:R575.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)32-4288-03

Construction of pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 lentiviral expression vector and its expression activity*

Yang Hua^{1,3}, Yang Shaoqi^{2△}, He Fang², Hu Jianguo², Li Peng^{1,2}

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Gastroenterology, the Affiliated General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China;
3. Department of NICU, the Affiliated General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To construct an Lentiviral expression vector of pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 targeting to MIA2 and investigate its effect on the expression of MIA2 and growth of HCC cell line HepG2 in vitro, observe MIA2 changes and the influence on apoptosis, thus to provide preliminary experimental fundament for successive researching on the role of MIA2 in the pathogenesis of HCC. **Methods** The sequence of pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 was designed and synthesized. The pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 Lentiviral expression vector was constructed and then transiently transfected into HepG2 HCC cells in vitro. The proportion of pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 positive cells was observed under the fluorescence microscope. Then, the expression level of MIA2 was detected by real time PCR. Moreover, the proliferation of HepG2 cells was observed by MTT assay and colony formation assay. Finally, the migration of HepG2 cells in vitro was also determined by Scratch assay. **Results** pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 Lentiviral expression vector was successfully constructed. Compared with control group (NC), the expression level of MIA2 was significantly decreased in transfected groups($P<0.05$); MTT assay showed that the proliferation of HepG2 cells was dramatically reduced in pIRES2-ZsGreen1-MIA2 transfected groups($P<0.05$); furthermore, the number of both colony forming and migrating cells were also remarkably reduced in transfected groups($P<0.05$). **Conclusion** The pIRES2-ZsGreen1-MIA2 can significantly reduce the expression level of MIA2 and inhibit the proliferation and migration of the HepG2 HCC cells in vitro.

Key words: liver neoplasms; cell proliferation; melanoma inhibitory activity related gene 2; HepG2 cells

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球常见的恶性肿瘤之一,病死率居世界第 2 位,严重危害人类的健康^[1]。近年来研究表明,黑色素瘤抑制蛋白 2(MIA2)表达异常与肝癌的发生、发展密切相关。发挥着抑癌基因的作用, MIA2 是近年发现的 MIA 家族的新成员, MIA 家族的其他成员包括 MIA、OTOR、TANGO^[2-3]。Bossert 等^[4]对人和小鼠的研究表明 MIA2 特异性的表达于肝脏组织中,在睾丸组织中有极少量表达。Hellerbrand 等^[5]的研究显示, MIA2 是一个能够抑制肝癌生长和侵袭的抑癌基因,肝癌组织中 MIA2 表达的缺失与肝癌生长和侵袭有关,而用 MIA2 基因重组质粒转染肝

癌细胞系和肝癌动物模型均显示出抑制肝癌细胞的增殖和侵袭的作用。本研究拟用分子生物学技术,构建 pIRES2-ZsGreen1-MIA2 慢病毒表达载体,观察其下调肝癌细胞 HepG2 中 MIA2 表达的效率 and 细胞体外生长及迁移的改变,为后续深入 MIA2 在肝癌发生、发展中的作用和机制提供前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 HepG, 大肠杆菌 DH5a 感受态细胞 2 细胞由宁夏医科大学冻存、PCR 酶、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; Marker IV、KB Ladder 为 Yr-

bio 公司自产。质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒均为 Yrbio 公司；自产引物合成；测序均在上海英俊完成；本实验所需的质粒 pDONR223-MIA2 购自 Yrbio 基因库。目的载体 pLVX-IRES-ZsGreen1 购自 Clontech，引物合成、测序均在上海英俊完成。Lipofectamine™ 2000 转染试剂试剂购自美国 Invitrogen 公司；PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 MIA2 真核表达载体的构建与鉴定 将质粒 pDONR223-MIA2 用 Spe I、BamH I 酶切，用 Spe I、BamH I 将 MIA2 的 PCR 片段及目的载体 pLVX-IRES-ZsGreen1 双酶切，然后进行连接，取 10 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，再切胶回收目的片段，挑取克隆，提质粒，进行鉴定，pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 构建成功。将酶切鉴定正确的 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 送去测序。用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 HepG2 细胞中 MIA2 的表达情况，MTT 法检测细胞增殖的情况。

1.2.2 细胞培养和转染 HepG2 细胞用含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养基，在 37 °C 饱和湿度、含 5% CO₂ 的孵箱中培养。当细胞贴壁达 80%~90% 时，按 3×10⁵/mL 的细胞密度接种于 6 孔板中。细胞转染实验分组：(1) 阴性对照组：转染 pLVX-pIRES2-ZsGreen1 空白质粒；(2) 实验组：转染 pLVX-pIRES2-ZsGreen1-MIA2 重组质粒。转染方法按照 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书操作。转染 48 h 后，倒置荧光显微镜下观察 MIA2 的表达量进而估算转染效率。

1.2.3 RT-PCR 检测各组细胞中目的基因的 mRNA 水平 收集细胞后，采用 Trizol 法提取细胞总 RNA，每组取 1 mg 总 RNA，反转录为 cDNA。配制 20 μL PCR 反应体系：无核酶水 5.2 μL，上下游引物各 0.4 μL，tagDNA 聚合酶 2.5 μL，模板 DNA 2.5 μL，4 种 dNTP 混合物 5.0 μL。引物设计以 GAPDH 为内参 GAPDH-F452：上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'，下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'，长度 452 bp；MIA2-501-r：上游 5'-GGC AAA CTT ACC CTT TCT GT-3'；下游 5'-GGC AAA CTT ACC CTT TCT GT-3'，长度 540 bp。调整好反应程序，将上述混合液稍加离心，立即置于 PCR 仪上，进行扩增。反应程序：70 °C 5 min；42 °C 60 min；70 °C 15 min；共 30 个循环。

1.2.4 噻唑蓝 (MTT) 实验检测转染后 HepG2 细胞的增殖 取处于对数生长期、生长状态良好的 HepG2 细胞以每孔 1×10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板中，每孔培养基体积 200 μL。待 HepG2 细胞贴壁 24 h 后，按照 Invitrogen 公司的 Lipofectamine™ 2000 转染步骤，将质粒 pIRES2-ZsGreen1 和 pIRES2-ZsGreen1-MIA2 分别转染 HepG2 细胞，37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。各组细胞在检测时间点时，每孔加 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL)，在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h；小心吸弃孔内培养上清液，每孔加 150 μL DMSO，振荡 10 min，使结晶物充分溶解选择 490 nm 波长，在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸度 (A) 值。

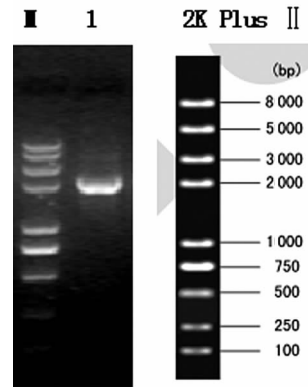
1.2.5 克隆形成实验检测 转染后 HepG2 细胞的体外增殖分别收集上述转染后各组细胞制备成单细胞悬液，6 孔板中每孔接种 2 mL，保持每孔细胞数目依次为 400 和 800 个；置 37 °C、5% CO₂ 中培养 10 d，当出现肉眼可见克隆时，弃去培养

液，终止培养。磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次，4% 多聚甲醛固定 30 min，置空气中干燥，用 1% 结晶紫染液染色 30 min，用 PBS 洗去染液，干燥后拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用两独立样本资料的 *t* 检验，计数资料以率表示，采用 χ^2 检验，以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

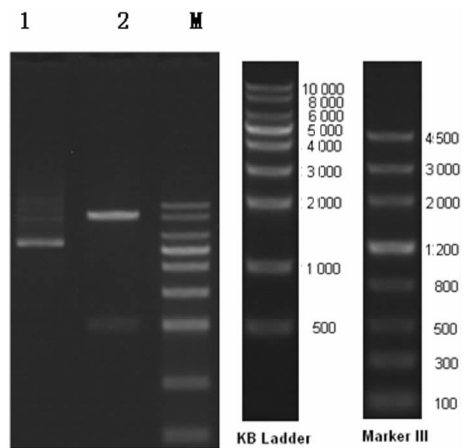
2.1 MIA2 PCR 扩增产物 pDONR223-MIA2 为模板，PCR 扩增 MIA2 的 CDS 区片段，将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，并回收 MIA2 条带。MIA2 PCR 扩增，重组质粒阳性克隆的 PCR 鉴定和双酶切、测序鉴定与 Invitrogen 公司的序列一致。



M: 2K Plus II DNA 分子标记物；1: MIA2 PCR 产物。

图 1 MIA2 PCR 扩增产物

2.2 慢病毒 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 质粒载体构建与鉴定 连接产物转化至 DH5 α 中挑取克隆，提质粒，进行鉴定 Spe I、BamH I 双酶切鉴定结果如下切出一约 2.0×10³ bp 的条带，见图 2。



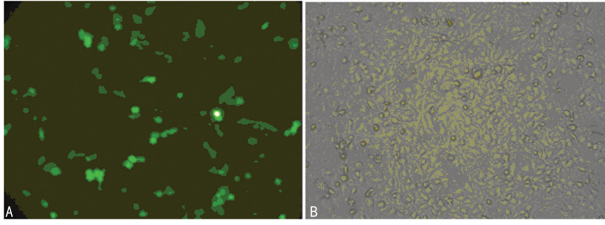
M: DNA 分子标志；1: pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 质粒；2: 经 Spe I、BamH I 双酶切的 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2。

图 2 慢病毒 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 质粒载体构建与鉴定

2.3 质粒 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 测序 将测序报告与欲得到的目的序列相比对，两者完全一致，pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 构建成功。

2.4 荧光显微镜观察转染 HepG2 细胞 MIA2 的表达 重组质粒转染 HepG2 细胞 36 h 后荧光显微镜下观察，重组质粒 IRES-ZsGreen1-MIA2 转染效率为 60%~70%，见图 3。

2.5 转染 HepG2 细胞后 MTT 检测结果 将质粒 pIRES2-ZsGreen1、pIRES2-ZsGreen1-MIA2 分别转染 HepG2 细胞 (4 $\mu\text{g}/\text{瓶}$)。在转染 4、24、48、72 h 后进行 MTT 检测。MTT 结果显示,阴性对照组 A 值为 0.71 ± 0.03 ,而实验组为 0.48 ± 0.02 ($P < 0.05$);测定 A 值后求平均值,两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。



A: 荧光显微镜; B: 普通光学显微镜。

图 3 荧光显微镜观察转染 HepG2 细胞 MIA2 的表达 ($\times 400$)

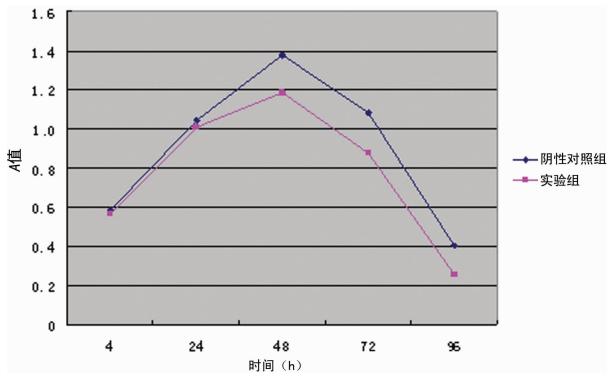


图 4 质粒转染 HepG2 细胞后 MTT 检测结果

3 讨论

HCC 是一种常见恶性肿瘤,寻找敏感而特异的肿瘤标志物对其早期发现,早期诊断和早期治疗至关重要。MIA2 是 MIA 家族的新成员,在人类的 14q13.4 号染色体的基因位点上^[6],MIA 是肝细胞特异性表达的一种可溶性蛋白质,其高表达于正常肝组织及肝纤维化组织,而在肝癌组织中低表达或不表达^[7]。本研究利用分子生物学技术构建慢病毒表达载体 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2,结果显示:转染该载体后 pLVX-pIRES2-ZsGreen1-MIA2 转染 HepG2 细胞后细胞增殖水平明显低于阴性对照组,基于慢病毒表达载体的建立可用于探讨 MIA2 在肝癌中的生物学作用,为进一步深入研究 MIA2 在肝癌中的分子生物学功能提供了重要基础。

有研究显示,MIA2 在肝癌发生、发展中起着重要的作用,如 Bosserhoff 等^[7]研究表明 MIA2 特异性的表达于肝脏组织中。Hellerbrand 等^[5]研究显示,肝癌组织中 MIA2 表达的缺失与肝癌生长和侵袭有关,而用 MIA2 基因重组质粒转染肝癌细胞系和肝癌动物模型均显示出抑制肝癌细胞的增殖和侵袭的作用,提示 MIA2 是一个能够抑制肝癌生长和侵袭的抑癌基因。本研究组前期研究了 MIA2 蛋白在 HCC 中的表达,结果显示肝癌组织中 MIA2 表达明显低于癌旁组织^[8],在研究 HBV 对肝癌细胞中 MIA2 表达的影响的实验结果显示 MIA2 蛋白在 HBV 阳性肝癌细胞中表达减低^[9]。同时应用甲基化酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷 MIA2 蛋白表达明显增强,细胞增殖受到抑制,细胞早期凋亡增加^[10],这些研究均表明,MIA2

与肝癌的发生、发展密切相关因此,深入探讨特定 MIA2 分子在肝癌发生、发展中的功能不仅对于阐明肝癌的发生机制,而且对于今后肝癌的临床诊断和基因治疗新靶标开发均具有重要意义。

本课题利用慢病毒表达载体 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 转染 HepG2 细胞后,通过 MTT 实验、克隆形成实验、阐明 MIA2 在体外能够抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖,然而 MIA2 在肝癌发生、发展中的确切机制仍不清楚,本研究将 IRES-ZsGreen1-MIA2 体外转染 HepG2 细胞后,MTT 实验和克隆形成实验显示肝癌细胞的体外生长受到明显抑制。进一步提示 MIA2 在肝癌发生、发展过程中起着抑癌基因的作用。

综上所述,本研究成功构建 pLVX-IRES-ZsGreen1-MIA2 慢病毒表达载体,并发现 MIA2 后可抑制人肝癌 HepG2 细胞的体外生长。这为笔者在后续研究中深入探讨 MIA2 在肝癌细胞生长中的作用机制,以及基于 MIA2 的肝癌生物治疗靶标开发提供了前期实验基础。

参考文献:

- [1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5): S27-S34.
- [2] Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6(9): 674-687.
- [3] Robertson NG, Heller S, Lin JS. A novel conserved cochlear gene, OTOR; identification, expression analysis, and chromosomal mapping[J]. *Genomics*, 2000, 66(3): 242-248.
- [4] Bosserhoff AK, Moser M, Buettner R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO[J]. *Gene Expr Patterns*, 2004, 4(4): 473-479.
- [5] Hellerbrand C, Amann T, Schlegel J, et al. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Gut*, 2008, 57(2): 243-251.
- [6] Bosserhoff AK, Moser M, Buettner R. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO[J]. *Gene expression patterns*, 2004, 4(4): 473-479.
- [7] Bosserhoff AK, Moser M, Scholmerich J, et al. Specific Expression and Regulation of the New Melanoma Inhibitory Activity-related Gene MIA2 in Hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(17): 15225-15231.
- [8] 杨帅, 杨少奇, 杨力, 等. 黑素瘤抑制蛋白 2 和 VEGF 在肝癌中的表达及其临床意义[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2011, 32(2): 211-214.
- [9] 姚文墩, 杨少奇, 杨力, 等. HBV 对肝癌细胞中 MIA2 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2013, 42(16): 1804-1805.
- [10] 杨少奇, 姚文墩, 杨花, 等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对 HepG2 中抑癌基因 MIA2 表达的影响[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2013, 34(4): 479-482.